

400

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NRDF DE MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE EM ESCHERICHIA COLI. Sharon Epstein, Henrique Bunselmeyer Ferreira (*orient.*) (UFRGS).

A pneumonia enzoótica, causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, afeta de 30 a 80% do rebanho suíno mundial, tendo baixa mortalidade, mas causando perda de peso e prejuízos econômicos. Os métodos de diagnóstico desta doença atualmente existentes apresentam eficiência limitada, por problemas de especificidade e sensibilidade. O objetivo deste trabalho é expressar em *Escherichia coli* a proteína NrdF, previamente descrita como antígeno vacinal, e utilizá-la na padronização de ELISA para imunodiagnóstico da pneumonia enzoótica suína. Com base nos dados obtidos a partir do seqüenciamento do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 a ORF correspondente à NrdF, foi identificada, amplificada a partir de um dos clones utilizados para seqüenciamento e clonada no vetor pUC18. Após, foi feita a sua subclonagem no vetor pGEX-4T1 e transformação em *Escherichia coli* BL21, para expressão na forma de fusão com glutathione-S-transferase (GST). Foram otimizadas as condições para expressão da proteína e para a sua solubilização, para posterior purificação. Os resultados indicam como melhor condição para expressão a multiplicação da bactéria a 37°C, e a indução da expressão da NrdF recombinante a 20°C, por 5h, por IPTG em uma concentração final de 0,5mM. Mesmo nas condições otimizadas, a NrdF-GST foi produzida predominantemente na forma insolúvel, tendo sido testados vários protocolos para a solubilização da mesma, com melhores resultados obtidos com a utilização de 2M de uréia. No entanto, não foi observada a ligação da proteína de fusão NrdF-GST à coluna de afinidade de glutathione-agarose, sugerindo desnaturação irreversível da mesma após o tratamento. Para purificação da NrdF-GST solúvel mas, desnaturada será agora utilizada uma coluna de afinidade de anticorpo monoclonal anti-GST. (Fapergs).